

Storskalig studie av nio gener hos 4 580 patienter med kronisk lymfatisk leukemi

Med hjälp av den nya generationens gensekvensering har flera studier under de senaste åren kunnat rapportera ett flertal gener som är muterade vid kronisk lymfatisk leukemi (KLL). Dessa mutationer ses ofta i en mindre andel av patienter med KLL och förknippas vanligen med dålig prognos.

Här beskriver docent **Larry Mansouri** vid Karolinska Institutet den senaste kunskapen på området.

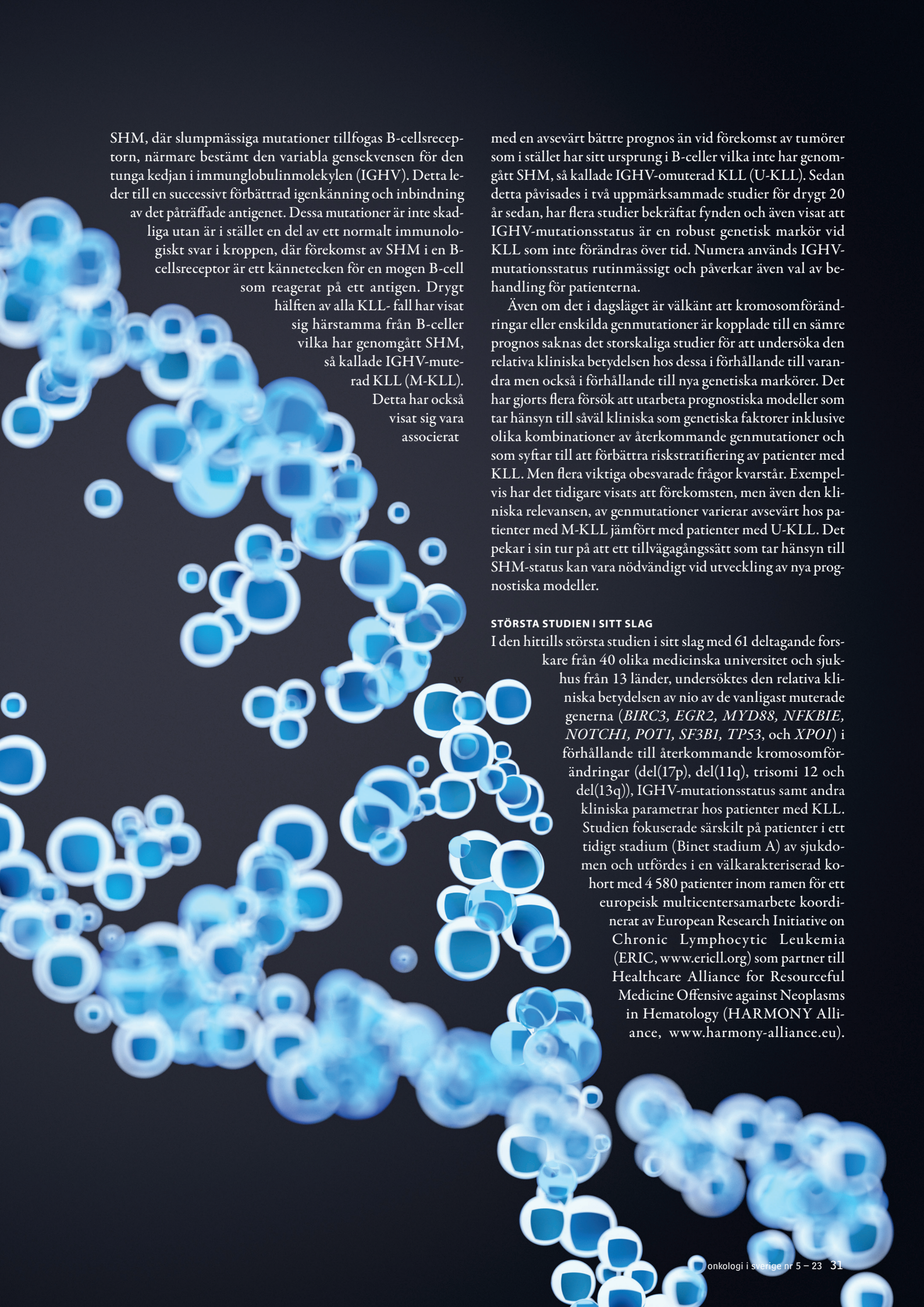
Kronisk lymfatisk leukemi (KLL) är den vanligaste formen av blodcancer i västvärlden och drabbar i första hand äldre vuxna, med en medianålder vid diagnos på 72 år. I Sverige ses en ökande prevalens, vilken för närvarande ligger runt 6 000 personer, och med en incidens på cirka 550 nya fall per år. Även om sjukdomen generellt anses vara obotlig är prognosen för de flesta god med en femårsöverlevnad som överstiger 90 procent för patienter yngre än 65 år vid diagnos och med en medianöverlevnad på mer än tio år för samtliga fall. Vid diagnos är endast en liten del av patienter med KLL (cirka 20 procent) behandlingskrävande, emedan drygt hälften av alla får behandling någon gång under sjukdomsförloppet. Behandlingsalternativen, vilka länge har bestått av kemoimmunterapi, har under senare år ersatts i allt högre grad av nya målinriktade terapier (BTK- och BCL2-hämmare), vilket i sin tur har resulterat i en förbättrad prognos för patienterna.

Även om KLL betraktas som en indolent cancerform drabbas ändå en betydande del av patienterna av en mer aggressiv sjukdom med sämre kliniskt utfall. Idag används flera olika genetiska markörer för att bedöma prognos och identifiera patienter som bör behandlas med målinriktade terapier. Till dessa markörer hör förekomst av stora, återkommande kromosomförändringar i arvsmassan, till exempel deletion på korta armen av kromosom 17 del(17p), eller en extra kromosom 12 (trisomi 12), IGHV-mutationsstatus, det vill säga förekomst av somatisk hypermutation (SHM) inom immunoglobulingenerna (förklarar nedan) samt punktmutationer,

exempelvis *TP53*-mutationer. På senare år har ytterligare återkommande mutationer påvisats med hjälp av nästa generations sekvensering (NGS). Dessa omfattar bland annat mutationer i *SF3B1*, *NOTCH1*, *NFKBIE*, *EGR2* och *XPO1*, som vardera förekommer i mindre än tio procent av fallen, men är kopplade till en sämre prognos.

GENOMGÅR BIOLOGISK PROCESS

När en normal B-cell påträffar ett kroppsfrämmande ämne eller antigen, genomgår den en biologisk process som kallas



SHM, där slumpmässiga mutationer tillfogas B-cellsreceptorn, närmare bestämt den variabla gensekvensen för den tunga kedjan i immunoglobulinmolekylen (IGHV). Detta leder till en successivt förbättrad igenkänning och inbindning av det påträffade antigenet. Dessa mutationer är inte skadliga utan är i stället en del av ett normalt immunologiskt svar i kroppen, där förekomst av SHM i en B-cellsreceptor är ett kännetecken för en mogen B-cell som reagerat på ett antigen. Drygt hälften av alla KLL-fall har visat sig härstamma från B-celler vilka har genomgått SHM, så kallade IGHV-muterad KLL (M-KLL). Detta har också visat sig vara associerat

med en avsevärt bättre prognos än vid förekomst av tumörer som i stället har sitt ursprung i B-celler vilka inte har genomgått SHM, så kallade IGHV-omuterad KLL (U-KLL). Sedan detta påvisades i två uppmärksammade studier för drygt 20 år sedan, har flera studier bekräftat fynden och även visat att IGHV-mutationsstatus är en robust genetisk markör vid KLL som inte förändras över tid. Numera används IGHV-mutationsstatus rutinmässigt och påverkar även val av behandling för patienterna.

Även om det i dagsläget är välkänt att kromosomförändringar eller enskilda genmutationer är kopplade till en sämre prognos saknas det storskaliga studier för att undersöka den relativa kliniska betydelsen hos dessa i förhållande till varandra men också i förhållande till nya genetiska markörer. Det har gjorts flera försök att utarbeta prognostiska modeller som tar hänsyn till såväl kliniska som genetiska faktorer inklusive olika kombinationer av återkommande genmutationer och som syftar till att förbättra riskstratifiering av patienter med KLL. Men flera viktiga obesvarade frågor kvarstår. Exempelvis har det tidigare visats att förekomsten, men även den kliniska relevansen, av genmutationer varierar avsevärt hos patienter med M-KLL jämfört med patienter med U-KLL. Det pekar i sin tur på att ett tillvägagångssätt som tar hänsyn till SHM-status kan vara nödvändigt vid utveckling av nya prognostiska modeller.

STÖRSTA STUDIEN I SITT SLAG

I den hittills största studien i sitt slag med 61 deltagande forskare från 40 olika medicinska universitet och sjukhus från 13 länder, undersöktes den relativa kliniska betydelsen av nio av de vanligast muterade generna (*BIRC3*, *EGR2*, *MYD88*, *NFKBIE*, *NOTCH1*, *POT1*, *SF3B1*, *TP53*, och *XPO1*) i förhållande till återkommande kromosomförändringar (del(17p), del(11q), trisomi 12 och del(13q)), IGHV-mutationsstatus samt andra kliniska parametrar hos patienter med KLL. Studien fokuserade särskilt på patienter i ett tidigt stadium (Binet stadium A) av sjukdomen och utfördes i en välkarakteriserad kohort med 4 580 patienter inom ramen för ett europeisk multicentersamarbete koordinerat av European Research Initiative on Chronic Lymphocytic Leukemia (ERIC, www.ericll.org) som partner till Healthcare Alliance for Resourceful Medicine Offensive against Neoplasms in Hematology (HARMONY Alliance, www.harmony-alliance.eu).

Den senare är delvis finansierad av Europeiska unionen genom forsknings- och innovationsprogrammet EU Horizon 2020 och har som uttalat mål att genom utnyttjandet av stora datasamlingar förbättra behandling och behandlingsalternativ för patienter med blodcancer.

Vi studerade nio av de vanligast muterade generna i KLL och kunde visa att 35 procent av patienterna bar på minst en genmutation. Bland dessa noterades en högre förekomst av mutationer i *NOTCH1*, *SF3B1* och *TP53* (samtliga dock under tio procent), medan mutationer i de övriga generna var mindre frekventa och hittades i två–fyra procent av patienterna. Vidare visade resultaten att mutationerna, undantaget *TP53* och *POT1*, var koncentrerade till så kallade ”hotspots”, det vill säga särskilda genregioner eller till och med specifika aminosyror. Genmutationer var avsevärt vanligare i U-KLL och detta var särskilt tydligt för mutationer i *NOTCH1*, *XPO1*, *NFKB1E* och *EGR2*, vilket också resulterade i sämre kliniskt utfall (i den här studien primärt definierat som tid från diagnos till start av första behandling). Undantaget var mutationer i *MYD88* som i stället var mer frekventa bland M-KLL och visade en mer gynnsam prognos. Bortsett från detta förekom mutationer i samtliga gener även i en mindre andel av patienter med M-KLL. Vidare kunde vi visa att mutationer i *NOTCH1* sammanföll med trisomi 12, samt att *BIRC3*-mutationer förekom ofta tillsammans med del(11q), medan mutationer i *MYD88* upptäcktes hos patienter med del(13q). Mutationer i *BIRC3*, *SF3B1*, *TP53* och *XPO1* förekom sällan eller aldrig i kombination med varandra vilket antyder att det är tillräckligt med någon av dessa för att utveckla en mer aggressiv sjukdom.

MUTATIONER SOM GER SÄMRE PROGNOIS

Som nämnts resulterade mutationer i samtliga gener förutom *MYD88* i en sämre prognos när dessa analyserades som enskilda variabler (univariatanalys). Detta gällde hela studiekohorten såväl som patienter som befinner sig i Binet stadium A. När genmutationerna i stället analyserades i en multivariat modell, där den relativa betydelsen av varje genmutation beräknas i förhållande till andra biomarkörer, var återigen genmutationer i samtliga gener förutom *MYD88* oberoende associerade till sämre prognos, både i hela den studerade kohorten men även bland patienter i Binet stadium A. Däremot, när samma analys utfördes bland patienter i Binet stadium A, men separat för de med U-KLL och M-KLL, var det endast mutationer i *SF3B1* och *XPO1* som visade sig vara signifikanta i de båda undergrupperna. Vidare noterades att mutationer i *NOTCH1* och *NFKB1E* endast utgjorde signifikanta kliniska markörer för patienter med M-KLL, medan avvikelser i *TP53*, *BIRC3* och *EGR2* endast var signifikanta för sämre prognos hos patienter med U-KLL.

Flera tidigare studier har analyserat effekten av återkommande genmutationer i KLL i relation till kliniskt utfall, beräknat som progressionsfri överlevnad och totalöverlevnad.

Baserat på dessa studier har det också utvecklats flera internationella prognosindex (till exempel CLL-IPI) för att identifiera patienter med högrisksjukdom eller hög risk för progression. Gemensamt för dessa är att ingen hänsyn har tagits till patienternas IGHV-mutationsstatus. Vi har tidigare i en preliminär studie visat att relevansen av olika genmutationer, men även olika andra biomarkörer, skiljer sig i patienter med U-KLL jämfört med M-KLL. I den aktuella studien bekräftar och utökar vi dessa initiala fynd avsevärt, vilket ytterligare understryker den varierande effekten av genmutationer i förhållande till IGHV-genens SHM-status. Därför, för att kunna identifiera KLL-patienter med hög risk för progressiv sjukdom och som är i tidigt behov av behandling, bör olika uppsättningar av genetiska biomarkörer användas vid U-KLL och M-KLL.

BEHÖVER UNDERSÖKAS VIDARE

En begränsning i vår multicenterstudie är datainsamlingen, där olika sekvenseringstekniker/riktade tillvägagångssätt har tillämpats med varierande känslighet för att upptäcka mutationer. För en mindre del av fallen genomfördes analysen av enbart hotspot-mutationer, exempelvis för *NFKB1E* (åtta procent av fallen) och *MYD88* (fyra procent av fallen), eller hotspot-exoner (*SF3B1* och *NOTCH1*). Till följd av detta kan den sanna frekvensen av mutationer potentiellt ha underskattats. Med detta sagt upptäcktes inga signifikanta skillnader i mutationsfrekvensen när resultaten från NGS- och Sanger-sekvensering jämfördes. Vidare visade det sig att endast hotspot-mutationerna i *NFKB1E* hade klinisk relevans medan den kliniska betydelsen av mutationer utanför hotspot-regioner behöver undersökas vidare för de återstående generna.

Sammanfattningsvis visar vår studie att mutationer i *SF3B1* är en nyckelbiomarkör i KLL och har en mycket stark negativ inverkan på kliniskt utfall beräknat som tid till första behandling, även hos patienter i Binet stadium A och oavsett SHM-status. Här är också mutationer i *XPO1* relevanta i båda undergrupperna. Vi visar också att *TP53*-avvikelser är kliniskt relevanta enbart i U-KLL, medan de verkar ha en obetydlig eller begränsad effekt i patienter med M-KLL. Ur ett kliniskt perspektiv kan våra resultat hjälpa till att identifiera högriskpatienter inom den heterogena M-KLL-undergruppen med potentiella implikationer för val av behandling och uppföljning. Eftersom de flesta kliniska laboratorier för närvarande använder NGS-baserad genpanelsekvensering för att upptäcka *TP53*-mutationer, skulle det vara informativt att i fortsättningen utöka analysen till andra gener för att identifiera högriskpatienter i rutindiagnostik. Slutligen bör framtida ansträngningar för att utveckla prognostiska modeller som inkluderar genmutationer och andra etablerade prognostiska faktorer tillämpa ett tillvägagångssätt som även tar hänsyn till SHM-status. Det kan förhoppningsvis bana väg för precisionsmedicin för patienter med KLL.

LARRY MANSOURI, DOCENT VID INSTITUTIONEN FÖR MOLEKYLÄRMEDICIN OCH KIRURGI, KAROLINSKA INSTITUTET, LARRY.MANSOURI@KI.SE

